Influence de la nature du sérum sur la réalisation de test de chimiosensibilité *in vitro* de *Plasmodium falciparum*

Effect of serum on the outcome of *in vitro* testing of the chemosensitivity of *Plasmodium falciparum*

ABSTRACT • *Plasmodium falciparum*, the parasite responsible for potentially fatal malaria, is a major cause of morbidity and of mortality in tropical countries. In vitro culture of *Plasmodium* remains indispensable for identification of phenotype and surveillance of the efficacy of antimalarial drugs. Culture of *Plasmodium falciparum* requires the use of RPMI 1640 medium, the efficacy of which depends on addition of human serum. Culture with medium containing either reference human serum of (RS) or serum containing *Plasmodium* antibodies (SND) provides a plasmodial maturation rate exceeding 20% (lower threshold of validity according to WHO). Comparison of these two culture supplements for *in vitro* testing of the chemosensitivity of *Plasmodium* strains to pyrimethamine showed no difference in IC50: < 2000 nM for sensitive strains (FCB1 and PFB) and > 2000 nM for resistant strains (K1).

KEY WORDS • *Plasmodium* antibodies. *Plasmodium* strains. Human serum.

Dans la lutte contre le paludisme, l'étude *in vitro* permet d'évaluer la sensibilité intrinsèque des parasites aux antipaludiques et de caractériser au plan épidémiologique la nature des isolats de *Plasmodium* circulant dans une zone donnée (1). Cette étude donne la possibilité de mesurer l'efficacité d'un antipaludique sans que n'interviennent les facteurs d'interférences dans la multiplication des parasites telle que l'immunité de l'hôte (2).

La culture de *Plasmodium falciparum* nécessite un milieu de culture, le RPMI 1640 (Roosvelt Park Medium Institute), dont l'efficacité est liée à l'addition de sérum humain soit dépourvu d'anticorps antiplasmodiaux, soit décomplémenté lorsque le sérum provient de sujet, vivant en zone d'endémie palustre (3,4). En effet, la présence d'anticorps antiplasmodiaux, tout comme les leucocytes dans le sang ajoute ses effets schizonticides à ceux du médicament étudié *in vitro*. La croissance des plasmodies est alors impossible par suite d'inhibition des jeunes trophozoïtes (5).

Si le sérum dépourvu d'anticorps est difficilement accessible à cause de son coût élevé, le deuxième type de sérum décomplémenté nécessite un travail supplémentaire de décomplémentation et de stérilisation sur filtre millipore.

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'efficacité du sérum humain non décomplémenté dans la culture *in vitro* de souches de *P. falciparum.*

Trois souches de *Plasmodium falciparum* PFB et FCB1 (souches résistantes à la chloroquine et sensible à la pyriméthamine) et K1 (souche résistante à la chloroquine et à la pyriméthamine) ainsi que des globules rouges sains du groupe 0+ ont servi de matériels biologiques. Ces hématies saines ont servi pour la dilution du sang parasité lorsque la densité parasitaire était supérieure à 8 000 parasites asexués par microlitre de sang.

Le RPMI 1640 contenant de l'HEPES 25 mM et du bicarbonate de sodium (NaHCO3) 25 mM a été utilisé comme milieu de culture pour les souches de *P. falciparum*. L'HEPES et le NaHCO3 jouent un rôle de double tampon et maintiennent le milieu de culture à un pH compris entre 7,2 et 7,4 (6). A ce milieu de culture, il est ajouté 10 % de sérum humain soit décomplémenté soit non décomplémenté.

Les souches PFB, FCB1 et K1 conservées dans l'azote liquide sont décongelées et maintenues en culture (en absence d'antipaludique) pendant quelques jours afin d'obtenir une bonne densité parasitaire. Avant la culture en présence d'antipaludique, on réalise une synchronisation de la culture par un traitement du sang parasité par du sorbitol à 5 % afin d'obtenir pour les tests des parasites au stade de jeunes parasites (« ring ») uniquement (7). Le sang est ensuite dilué si nécessaire par des globules rouges non parasités préalablement lavés.

Dans la première partie du travail, les souches sont maintenues en culture dans le RPS (RPMI appauvri en acide folique et contenant 10 % de sérum humain) dans une étuve réglée à 37°C en présence de gaz carbonique et 95 % d'humidité pendant 42 heures dans une jarre à bougie (8, 9). Le sérum humain ajouté est soit décomplémenté et a servi de référence (SR) soit non décomplémenté (SND). La décomplémentation se fait dans un bain-marie à 50°C pendant au moins 45 minutes (3) suivit d'une stérilisation sur filtre millipore. Ainsi, deux tubes contenant le même sérum dont le premier est décomplémenté et le deuxième non décomplémenté (SND) ont été préparés pour réaliser les tests de maturation *in vitro* dans les mêmes conditions.

La vérification de la maturation est faite après 42 heures d'incubation par le comptage du nombre de schizontes pour 200 parasites asexués, après lecture des gouttes épaisses réalisées à partir des cultures en absence d'antipaludique.

La deuxième partie de ce travail a été consacrée au test de chimiosensibilité à la pyriméthamine en utilisant le SR parallèlement au SND pour vérifier la sensibilité des souches à la pyriméthamine.

C'est la variante isotopique du microtest OMS qui a été utilisée dans ce travail (2). Elle mesure la capacité de doses croissantes d'un antipaludique à inhiber la croissance de *Plasmodium* dans un milieu de culture (RPMI contenant du sérum humain). Après 42 heures d'incubation, l'ADN est recueilli après lavage sur un papier de fibre de verre à l'aide d'un collecteur cellulaire, puis, la quantité d'hypoxanthine incorporée par les parasites est mesurée par un compteur à scintillation liquide (WALLAC, 1450 Microbeta TRILUX) en coup par minute.

Une droite de régression tracée par un programme à partir de ces valeurs permet de déterminer la CI50 de chaque produit sur les deux souches pour chaque type de sérum.

Le sérum humain référentiel ajouté au RPMI 1640 de lavage à permis d'obtenir des maturations de trophozoïtes de *P. falciparum* en schizontes supérieur à 20 % (taux de maturation référentiel pour valider la culture *in vitro*) et ce, quelque soit la souche plasmodiale. Cette maturation est de 83 % pour FCB1, 75 % pour PFB et 90 % pour K1. Lorsque le sérum n'est pas décomplémenté (SND, essai), le taux de maturation varie de 77 % pour FCB1, 70% pour PFB et de 80 % pour K1.

Les résultats obtenus dans les tests de chimiosensibilité *in vitro* des souches dans un milieu contenant du sérum non décomplémenté avoisinent ceux obtenus avec le sérum de référence ($t < 2,776$). Les CI_{50} moyenne de la pyriméthamine sont respectivement 253,60 ± 52,75, 48,94 ± 1,34 et 4876,8 ± 562,57 nM pour les souches FCB1, PFB et K1 sur SR. Ces CI_{50} moyennes étaient de 230,58 ± 29,69, 48,29 ± 0,04 et 4877 ± 216,37 nM sur SND (tableau 1).

A l'analyse des résultats obtenus avec le SND (77 % pour FCB1, 70 % pour PFB et 80 % pour K1), il ressort que le sérum non décomplémenté ne présente pas de risque d'inhibition de la maturation des plasmodies en culture *in vitro*. Il permet d'obtenir des

Tableau 1. Sensibilité in vitro *à la pyriméthamine des souches de P. falciparum selon le sérum ajouté au milieu de culture (RPMI 1640).*

	CI_{50} en nM de la pyriméthamine (*n = 3)		
	Sérum décomplémenté (SR)	Sérum non décomplémenté (SND)	Test de student à 5%
FCB1	253,31 ± 52,75	230,58 ± 29,69	0,043
PFB	48,94 ± 1,34	48,29 ± 0,04	0,002
K1	4876,8 ± 52,57	4804,75 ± 216,37	0,001

n est le nombre de tests réalisés.

résultats aussi satisfaisants que le SR suggéré et utilisé jusqu'alors au cours de l'évaluation *in vitro* de la chimiosensibilité de *P. falciparum*. Le taux référentiel de croissance des jeunes trophozoïtes en schizontes indiqué par l'OMS pour valider un test de chimiosensibilité et déterminer ensuite l'activité antiplasmodiale d'une substance est de 20 % (3).

L'intérêt de cette étude était d'obtenir au moins 20 % de schizontes dans les cultures sans antipaludique et sans hypoxanthine qui nous ont servi de témoins afin de lancer nos tests isotopiques et de déterminer la CI_{50} des souches vis-à-vis de la pyriméthamine sur milieu contenant du SND.

En effet, si certains auteurs ont démontré le rôle déterminant des anticorps antiplasmodiaux dans l'immunité contre les formes sanguines asexuées de *P. falciparum* (5), de nombreux travaux ont tenté de déterminer le mode d'action de ces anticorps (10). Il a été mis en évidence à la surface des globules rouges parasités par *P. falciparum*, un antigène spécifique appelé antigène HRP2 (Histidine Rich Protein 2) qui est une glycoprotéine avec le galactose comme sucre. La reconnaissance de cette protéine par les anticorps antiplasmodiaux permet de former un complexe qui exerce une action destructrice sur le *Plasmodium* à l'intérieur du globule rouge. La série de lavage (trois fois) entreprise suivie de centrifugations puis de l'élimination de la couche leuco-plaquettaire avant la mise en culture des parasites, a pour but d'éliminer les protéines HRP2 présentes à la surface des hématies parasitées et nécessaires à la fixation des anticorps et à la formation du complexe anticorps-anti-HRP2. A la fin de ce lavage, nous obtenons des globules rouges dépourvus ou faiblement pourvus de protéines HRP2 ; dès lors le *Plasmodium* peut subir une maturation par division mitotique de son noyau et atteindre le stade schizontes (stade à plusieurs noyaux).

Ces résultats sont en accord avec les tests de Djaman, qui a obtenu des résultats similaires avec des isolats de la nature et une même sensibilité avec la chloroquine (11).

Dans ces conditions, il est possible avec le SND, de réaliser un test de chimiosensibilité qui permet de mesurer la capacité de concentrations croissantes d'un antipaludique à inhiber la formation des schizontes.

Il a été possible de réaliser les cultures *in vitro* de *P. falciparum* en utilisant un SND. Le paludisme étant une maladie infectieuse qui touche particulièrement l'Afrique subsaharienne (4), l'utilisation SND additionné au RPMI est de permettre aux laboratoires du sud avec les moyens dont ils disposent de réaliser une surveillance des souches de *P. falciparum* circulant dans une zone donnée. Il est également possible de mesurer la sensibilité de ces souches par rapport aux antipaludiques usuels et permettre le criblage systématique de nouvelles substances antipaludiques comme celles issues de la pharmacopée traditionnelle africaine (12, 13).

Kipre GR[1], Guede-Guina F[1], Outtara L[1], Grellier P[3], Djaman AJ[1,2]

1. Laboratoire de Pharmacodynamie-biochimique, UFR Biosciences, Université de Cocody-Abidjan,
2. Laboratoire de biochimie, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire,
3. USM 0504 « Biologie fonctionnelle des protozoaires » EA 3335 Département « Régulation, Développement, Diversité Moléculaire » Muséum National d'Histoire Naturelle.

• *Correspondance : kip_rolland@yahoo.fr*
• *Article reçu le 17/11/2008, définitivement accepté le 26/07/2010*

1. Guiguemde TR, Gbary AR, Coulibaly SO, Ouedraogo JB. Comment réaliser et interpréter les résultats d'une épreuve de chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* chez les sujets malades en zone tropicale. *Sante* 1996 ; 6 : 187-91.
2. Rieckmann KH, López-Antuñamo FJ. Chloroquine resistance of *Plasmodium falciprum* in Brazil detected by a simple *in vitro* method. *Bull World Health Organ* 1971 ; 45 : 157-67.
3. Schlichtherle M, Wahlgren M, Perlmann H, Scherl A. Methods in Malaria Research. Third Ed. Available from Malaria Research and Reference Resource Center (MR4), Manassas, Virginia USA 2000; 77 p.
4. WHO. Paludisme. Aide-mémoire N° 94 révisé Octobre 1998 ; 6 p.
5. Danis M, Mouchet J. La réponse immune de l'hôte et l'adaptation du parasite et chimiorésistance des Plasmodiums in Paludisme. Marketing : Ellipses ed., 1991, 240 p.
6. WHO. Mode d'emploi du nécessaire d'épreuve (Microtest) pour l'évaluation de la réponse de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine et à la méfloquine *in vitro.* OMS, Genève, MAP/84.2. 1984 ; 9 p.
7. Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* 1979 ; 65 : 418-20.
8. Le Bras J, Deloron P. *in vitro* study of drug sensitivity of *Plasmodium falciparum:* evaluation of a new semi-micro test. *Am J Trop Med Hyg* 1983 ; 32 : 447-51.
9. Le Bras J, Deloron P, Ricour A, Andrieu B, Savel J, Coulaud JP. *Plasmodium falciparum:* drug sensitivity *in vitro* of isolates before and after adaptation to continuous culture. *Exp Parasitol* 1983 ; 56 : 9-14.
10. Bruce-Chwatt LJ, Black RH, Canfield GJ, Clyde DF, Peters W, Wernsdorfer WH. Rôle de l'immunité dans la chimiothérapie du paludisme in chimiothérapie du paludisme. 2e édition/OMS ed., Genève, 1984, 274 p.
11. Djaman JA, Coulibaly PA, Guédé-Guina F. Culture *in vitro* d'isolats de *Plasmodium falciparum* sur milieu contenant du sérum humain non décomplémenté. *Rev Iv Sci Tech* 2002 ; 3 : 119-26.
12. O'Neil MJ, Bray DH, Boardman P, Phillipson JD, Warhurst DC, Peters W *et al.* Plants as sources of antimalarial drugs: *in vitro* antimalarial activities of some quassinoids. *Antimicrob Agents Chemother* 1986 ; 30 : 101-4.
13. Phillipson JD, O'Neil MJ. Novel antimalarial drug from plants? *Parasitology Today* 1986 ; 2 : 355-8.